Die Brauchbarkeit der Babesia rodhaini-Antigene zum Nachweis von Babesien-Infektionen im ELISA

Irmgard Kratzer

1979

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Die Brauchbarkeit der Babesia rodhaini-Antigene zum Nachweis von Babesien-Infektionen im ELISA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Irmgard Kratzer
aus
Bayrischzell

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. D.O. Schmid

Tag der Promotion: 23. Februar 1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Die Serodiagnostik der Babesiosen mit somatischen und metabolischen Antigenen (anhand der Literatur) 2

III. Eigene Untersuchungen 11
A. Material und Methoden 11
B. Ergebnisse 20
1. Die säulenchromatographische Auftrennung der Antigene 20
2. Reaktionen der Antigenfraktionen mit Hyperimmunseren 22
3. Titerverlaufskurven bei experimentell mit Babesien infizierten Mäusen 25
4. Titerverlaufskurven bei experimentell mit Babesien infizierten Hunden 29
5. Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von Babesien-Infektionen bei Rindern und Pferden 33

IV. Besprechung der Ergebnisse 35

V. Zusammenfassung und Summary 41

VI. Literaturverzeichnis 43

Lebenslauf

I. Einleitung

Das Vorkommen der Babesiosen der Haustiere, besonders der Rinder, beschränkt sich nicht auf tropische Gebiete. Babesien-Infektionen sind auch in europäischen Breiten epizootisch, wenn der geeignete Vektor vorhanden ist. In der latenten Phase der Infektion fällt der mikroskopische Nachweis des Erregers im gefärbten Blutausstrich oft negativ aus. Diese Tiere jedoch stellen ein permanentes Erregerreservoir dar.

Eine wirksame Bekämpfung der Babesiosen muß die Erkennung aller Trägertiere umfassen. Serologische Untersuchungen sind unumgänglich, um den Durchseuchungsgrad einer Herde zu bestimmen. Unter Feldbedingungen müssen serologische Methoden einfach und schnell durchführbar sein.

Das Ziel meiner Arbeit war, mit Ektoantigenen und somatischen Extraktantigenen von Babesia rodhaini Antikörper anderer Babesienarten und damit Infektionen der Maus, des Hundes, des Rindes und des Pferdes mit Hilfe des E L I S A nachzuweisen.

II. Die Serodiagnostik der Babesiosen mit somatischen und metabolischen Antigenen (anhand der Literatur)

Im Verlauf einer frischen Babesieninfektion kann der Erreger meist direkt im gefärbten Blutausstrich diagnostiziert werden. Zur Erkennung latenter Babesiosen gewann der indirekte Erregernachweis an Bedeutung. Die fortschreitende Entwicklung der Babesienserologie ermöglichte die Durchführung epidemiologischer Untersuchungen. Dabei hing die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse in der Serodiagnostik nicht nur von den verwendeten Antigenen, sondern auch von der jeweiligen serologischen Methode ab.

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) war die erste Untersuchungsmethode, die zur Diagnose der Babesiosen herangezogen wurde. Bereits HIRATO und Mitarb. (1945) konnten im Verlaufe einer Babesia caballi- Infektion komplementbindende Antikörper 11 - 15 Tage nach Auftreten der Parasitämie nachweisen.
MAHONEY (1962) setzte die KBR bei Babesieninfektionen des Rindes (B. argentina und B. bigemina) ein. Antikörper traten zu Beginn der Parasitämie auf und blieben lange Zeit bestehen, nachdem Parasiten im Blutausstrich nicht mehr erfaßbar waren. MAHONEY (1964) konnte nach weiterführenden Versuchen feststellen, daß sich die KBR besonders zur Diagnose bei latent infizierten Tieren eignet.
SCHINDLER und DENNIG (1962) überprüften die Brauchbarkeit der KBR zum Nachweis von Babesieninfektionen bei Hunden. Sie konnten bei Versuchstieren, die experimentell mit B.canis infiziert wurden, Antikörper vom 11.-34.Tag finden.
Bestand das Antigen, das HIRATO und Mitarb. (1945) verwendeten, aus Babesien enthaltenden Erythrozyten, so isolierte MAHONEY (1962)ein Antigen aus mit Aqua dest. hämolysierten Erythrozyten. SCHINDLER und DENNIG (1962) gewannen ihr Antigen, indem sie mit B.canis infizierte

Erythrozyten einer Saponinhämolyse unterwarfen. MAHONEY (1967) sah die Schwierigkeiten zur Durchführung bzw. Anwendbarkeit der KBR darin, ein Parasiten-Antigen unter wirtschaftlichen Aspekten zu gewinnen und mit hoher komplementbindender Aktivität. Bei Vergleichsuntersuchungen wichen die Ergebnisse entsprechend der Darstellung und dem Einsatz der Antigene voneinander ab.
TODOROVIC (1975) fand die KBR wegen der mangelnden Reinheit der Antigene nicht genügend zuverlässig und wenig empfindlich im Vergleich zu anderen serologischen Untersuchungsmethoden.

RISTIC und SIBINOVIC (1964) untersuchten Seren von Pferden mit akuter Babesiose (B.caballi) und von infektionsverdächtigen Tieren in der Gelpräzipitation. Dabei fielen alle Tiere mit positivem Erregernachweis im Test ebenso positiv aus wie sämtliche fraglichen Pferde. Das Bestehen einer Infektion wurde durch eine Rückübertragung gesichert. Der Beweis der Spezifität erfolgte in der Testung mit Pferdeseren, die Antikörper gegen andere Infektionskrankheiten (infektiöse Anämie eingeschlossen) besaßen. Keines dieser Seren zeigte eine positive Reaktion. Die Autoren hielten den Test für genau und spezifisch für die Pferdebabesiose. Es gelang SIBINOVIC und Mitarb. (1965) in weiteren Versuchen, in Seren latent infizierter Pferde Antikörper in verschieden hohen Titern über 10 Monate hinweg nachzuweisen.
GOLDMANN und BUKOVSKY (1975) untersuchten die Einsatzmöglichkeit des Präzipitationstestes für die Diagnose der Rinderbabesiose, speziell einer B.bigemina-Infektion. Dabei überprüften sie Seren sowohl von Tieren, die nach der Immunisierung entmilzt wurden, als auch von immunisierten Kälbern und Milchkühen mit einer chronischen Babesiose. Als Kontrolle diente der Immunfluoreszenztest, mit dem eine 77% Übereinstimmung der Testergebnisse erzielt wurde.

POPOVIC und RISTIC (1970) konnten bei Hunden 17 Tage nach der experimentellen Infektion mit B.canis präzipitierende Antikörper nachweisen, die über einen Zeitraum von 10 Monaten gleich intensiv reagierten. Als Kontrollseren wurden antikörperhaltige Seren von Hunden mit Staupe,HCC und Leptospirose eingesetzt, die keine positiven Reaktionen zeigten. Damit war die Spezifität des Nachweises,analog des Versuches an Pferden, erbracht.
Im Präzipitationstest kamen Antigene zum Einsatz, die durch verschiedene Techniken gewonnen wurden. RISTIC und SIBINOVIC (1964) verwendeten ein Antigen, das sie aus dem Hämolysat frisch mit B.caballi infizierter Pferde durch Fällung mit Protaminsulfat erhielten. POPOVIC und RISTIC (1970) übernahmen diese Methode ebenfalls zur Herstellung eines B.canis-Antigens. SIBINOVIC und Mitarb.(1965) setzten mit Erfolg serumlösliche oder metabolische Antigene zum Nachweis latent mit B.caballi infizierter Pferde ein. GOLDMANN und BUKOVSKY (1975) testeten lösliche Antigene aus allen Phasen eines mit B.bigemina infizierten Rindes. Das Antigen wurde sowohl aus dem Serum und Hämolysat durch Elution an einer DEAE-Säule und anschließender Präzipitation mit Natriumsulfat als auch von gewaschenem Parasiten-Erythrozytenstroma nach Sprengung der Zellstrukturen durch Ultraschall oder mehrmaliges Frieren und Auftauen hergestellt.Alle Antigenfraktionen reagierten gleich intensiv und spezifisch.
Der Präzipitationstest ist einfach auszuführen, erfordert keinen großen technischen Aufwand und eignet sich daher gut zur Routinediagnose. Die Reaktionen sind leicht zu beurteilen und stellen keine Anforderung an die Erfahrung des Untersuchers. Von Vorteil sind die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der erfolgreiche Einsatz von Antigenen, die auf verschiedene Weise gewonnen wurden.
Der Präzipitationstest fand trotzdem keine breite Anwendung in der Praxis;vielmehr wurde er zur Analyse der

Antigenstruktur der Ektoantigene z.B. von TODOROVIC und ADAMS (1971) herangezogen.

RISTIC und SIBINOVIC (1964) untersuchten Seren von 14 Pferden, die latent mit B.caballi infiziert waren, und von 10 offensichtlich gesunden Pferden im indirekten Fluoreszenzantikörpertest (IFAT). Die infizierten Tiere reagierten mehr oder weniger stark; allerdings hatten auch 2 der 10 gesunden Pferde Antikörper entwickelt. Bei Rindern konnten ROSS und LÖHR (1968) mit dem IFAT Antikörper 2 Jahre lang nach einer B.bigemina- Infektion nachweisen. Die Titer erreichten 21 Tage p.i. eine Höhe von 1 : 1280 und fielen schrittweise innerhalb von 6 Monaten ab; jedoch war noch nach 18 - 24 Monaten eine positive Reaktion im IFAT erkennbar. DONNELLY, JOYNER und CROSSMAN (1972) gelang es, mit Hilfe des IFAT die Infektionsrate in einer Herde von Milchkühen nach einem natürlichen Ausbruch einer B.divergens- Infektion zu bestimmen. Die Zahl der infizierten Tiere war abhängig von der jahreszeitlich unterschiedlichen Aktivität der Zecken. Im Zeitraum, in dem die Zecken aktiv waren, wurden pro Monat 36% der Tiere infiziert, so daß nach 105 Tagen 80% der Rinder, die der natürlichen Infektion auf der Weide ausgesetzt waren, Antikörper besaßen. Sie waren kurz nach Auftreten der Parasitämie im IFAT erkennbar und persistierten lange Zeit. Auch JOYNER, DONNELLY und PAYNE (1972) konnten hohe Antikörpertiter bei Rindern, die eine B.major- und B.divergens- Infektion überstanden hatten, im IFAT nachweisen. Vergleichsuntersuchungen an 372 Serumproben von Rindern mit einer natürlichen Babesieninfektion (B.argentina und B.bigemina) führten TODOROVIC und LONG (1976) mit dem IFAT und mit der KBR gleichzeitig durch. Der IFAT war empfindlicher und zeigte 4 Wochen bei einer B.argentina- und 2 1/2 Wochen bei einer B.bigemina- Infektion früher als die KBR Antikörper an.

Es ist bekannt, daß der Fluoreszenztest erhebliche Anforderungen an die Laborausstattung stellt und ein empfindliches Fluoreszenzmikroskop erfordert. Auch ergeben sich nicht selten beim Ablesen und Interpretieren der Ergebnisse gewisse Schwierigkeiten. Die Differenzierung zwischen einer schwach positiven und negativen Reaktion setzt beträchtliche Erfahrungen voraus.

SIBINOVIC, SIBINOVIC und RISTIC (1969) infizierten 2 Pferde mit B.caballi und mit B.equi und gewannen 50 Wochen lang Serumproben. In 2 Agglutinationstesten - Bentonitagglutinationstest (BA) und indirekter Hämagglutinationstest (IHA)- gelang der Antikörpernachweis; gleichzeitig setzten sie den Gelpräzipitationstest ein. Übereinstimmend stiegen in der ersten Woche p.i. die Titer im BA und IHA an, erreichten einen Höhepunkt in der 9. Woche p.i. und fielen allmählich bis zur 50. Woche ab. Im Gelpräzipitationstest blieb der Titer über 50 Wochen konstant.
CURNOW und CURNOW (1967) konnten mit dem IHA auch bei experimentell mit B.argentina infizierten Rindern Antikörper nachweisen. Die gleichzeitig eingesetzte KBR erbrachte ähnliche Ergebnisse. Es zeigte sich, daß beide serologischen Methoden genügend empfindlich und spezifisch waren, um Antikörper über einen Zeitraum von 7 Tagen bis 22 Monaten p.i. zu erfassen. In nachfolgenden Felduntersuchungen war allerdings der IHA der KBR überlegen, da in der KBR 80 Tiere, im IHA nur 18 falsch positiv reagierten. Auch GOODGER (1971) gelang im IHA der Antikörpernachweis 2 - 3 Wochen bis 12 Monate nach Infektion von Rindern mit B.argentina und B.bigemina.

Für epidemiologische Untersuchungen wird von der Praxis ein einfacher Feldtest verlangt. Als solcher bot sich der Kapillarröhrchen - Agglutinationstest (KA) an, den LÖHR

und ROSS (1969) zum Nachweis von B.bigemina- Antikörpern entwickelten. Eine 100% ige Genauigkeit wurde mit 92 negativen und 131 positiven Kontrollseren erzielt. Antikörper traten durchschnittlich 1 - 2 Tage nach dem Sichtbarwerden von B.bigemina Parasiten im Blutausstrich auf. Maximaltiter von 1 : 160 und 1 : 320 hatten Tiere unmittelbar nach Abklingen der Parasitämien. Agglutinierende Antikörper konnten 18 - 26 Monate p.i. nachgewiesen werden. Die Autoren setzten den KA erfolgreich zur Überprüfung vakzinierter Rinder ein.

Eine weitere Vereinfachung der Untersuchungen brachte der Babesia Card Agglutination Test (BCT), der von TODOROVIC und KUTTLER (1974) in die Praxis eingeführt wurde. Es genügen ein Tropfen Antigen und 2 Tropfen Serum; unter kreisenden Bewegungen werden sie auf einem Blatt gemischt. Die Reaktion lässt sich bereits nach 5 Minuten ablesen. Die im BCT erfaßbaren Antikörper erschienen gleichzeitig mit dem Auftreten der Parasitämie und waren bis 12 Wochen p.i. nachweisbar. Die Resultate stimmten mit denen der KBR überein.

B.canis-Antikörper wiesen im Tube - Latex - Agglutinationstest (TLA) ZUCKERMAN und RISTIC (1968) nach. Titer traten erstmals 15 Tage p.i. auf, erreichten etwa 2 Monate später ihre maximale Höhe und persistierten in niedrigen Titerstufen während der nächsten 2 Monate. Einen ähnlichen Test führten LÓPEZ und TODOROVIC (1978) als Rapid Latex Agglutinationstest (RLA) zur Diagnose von B.argentina- Infektionen aus. Gleichzeitig kamen die KBR und der IFAT zum Einsatz, mit denen eine weitgehende Übereinstimmung erzielt wurde.

CURNOW und CURNOW (1967), SIBINOVIC, SIBINOVIC und RISTIC (1969) und GOODGER (1971) verwendeten im IHA - Test mit Tanninsäure und Formalin vorbehandelte Schaferythrozyten,

die mit löslichem Antigen sensibilisiert wurden. CURNOW und CURNOW (1967) isolierten das Antigen aus mit B.argentina infizierten Erythrozyten durch Extraktion mit destilliertem Wasser; es bestand aus bloßem Parasiten- und Erythrozytenstroma.
Die Reinigung des Antigens durch physikalische und chemische Verfahren versprach die Wirksamkeit der Antigene zu erhöhen. So unterwarf GOODGER (1971) eine B.argentina - haltige Erythrozytensuspension der Ultraschallbehandlung und trennte das in Phosphatpuffer lösliche Material durch Gelfiltration auf. Er erhielt 2 Fraktionen, von denen nur eine positiv im IHA reagierte. Ein weiteres Antigen gewann er aus dem Lysat der infizierten Erythrozyten. Er entfernte das Hämoglobin durch Auftrennung des Materials an einer DEAE - Säule. Danach beschickte er eine Sephadex Gelsäule mit dem Lysat, wobei eine der 3 gewonnenen Fraktionen am stärksten im IHA reagierte. SIBINOVIC, SIBINOVIC und RISTIC (1969) verwendeten ein hitzestabiles Polysaccharid als Antigen, das sie aus mit B.caballi und B.equi infizierten Erythrozyten isolierten. ZUCKERMAN und RISTIC (1968) adsorbierten metabolische Antigene, die während einer frischen B.canis- Infektion aufgetreten waren, an Latexpartikel. Die Herstellung der Antigene, die in weiteren Agglutinationstesten eingesetzt wurden, bestand in der Gewinnung eines gereinigten, löslichen Parasitenmaterials. So variierte die Darstellung in Erythrozytenlyse, Ultraschallbehandlung, Zellhomogenisation und Ultrazentrifugation.

Untersuchungsmethoden, die an ein Labor gebunden sind, können in vielen Ländern nicht ausgeführt werden. Andrerseits ist es nicht möglich, diese Methoden im Feld einzusetzen, wo rasche Entscheidungen nötig sind, um adäquate Kontrollmaßnahmen zu treffen. Deshalb stellen BCT, RLA und KA-Test einen wesentlichen Fortschritt in der Entwicklung der Babesienserologie dar. Die Ausführung der Agglutinationsteste verlangt stabile Zellsuspensionen und damit die Ver-

meidung aller Faktoren, die eine spontane Agglutination bewirken. Falsch positive Reaktionen zeigen sich unter anderem, wenn Plasma trotz Antikoagulantien spontan gerinnt oder durch eine pH - Änderung die reaktiven Komponenten verklumpen.

ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelten den Enzyme-linked-immunosorbent - assay (ELISA), mit dem sich ein neues Verfahren zum Antikörpernachweis bot. Dabei werden spezifische Antikörper durch Enzym-gekoppelte Antiglobuline in Antigen-beschichteten Polystyrolplatten nachgewiesen. Nach Ablauf der Antigen- Antikörper-Antiglobulin- Reaktion spaltet das ans Antiglobulin gebundene Enzym ein Substrat, das eine Farbreaktion nach sich zieht, den Antikörpergehalt sichtbar macht und eine Titerbestimmung ermöglicht. Polystyrol kann Proteinmoleküle (Antigene) an seiner Oberfläche adsorbieren. Antigene lassen sich so in Polystyrolmikrotiterplatten anlagern und gehen mit Antikörpern spezifische Reaktionen ein.
PURNELL und HENDRY (1976) arbeiteten den ELISA zum Antikörpernachweis einer B. divergens-Infektion aus. Die Ergebnisse zeigten, daß mit Hilfe des ELISA der Antikörpertiter 14 Tage p.i. einen Höhepunkt erreichte. Die Antikörper waren bis zu 2 Monaten p.i. nachweisbar. Vom Beginn der Infektion bis zu 14 Tagen p.i. verlief der Test negativ, obwohl in dieser Zeit Parasiten im Blut mikroskopisch erfaßbar waren. Als Antigen verwendeten sie somatische Extraktantigene von B. divergens.
WEILAND und DOHNA (1978) immunisierten mit somatischem Extraktantigen Mäuse gegen B. rodhaini und B. galagolata, Hunde gegen B. canis sowie Kaninchen gegen die 3 Babesienarten. Sie gewannen aus den Tieren Hochimmunseren für den Einsatz im ELISA. Als Antigene verwendeten sie an der Chromatographiesäule fraktionierte Ektoantigene von B. rodhaini, B.galagolata und B. canis. Die stärkste Reaktion von 3 Frak-

tionen ergab die Fraktion I. Die Reinheit der Antigene erwies sich als nicht ausreichend, um eine serologische Artendifferenzierung zu erzielen. Jedoch stellten sie fest, daß das B. rodhaini-Antigen eine Kreuzreaktion zu B. galagolata- und B. canis- Antikörpern aufweist, wobei sich zwischen B.rodhaini - und B. canis - Antigenen schwächere Reaktionen zeigten als zwischen B. rodhaini und B. galagolata. Dies ließ bei den untersuchten Babesienarten auf gemeinsame Teilantigene schließen. Die Vermutung lag nahe, daß das stark kreuzreagierende B. rodhaini-Antigen in der Lage ist, Antikörper anderer Babesienarten nachweisen zu können.
In meinen eigenen Untersuchungen verwendete ich zum Antikörpernachweis metabolisches Antigen und somatisches Gesamtextraktantigen von B. rodhaini, da nach Untersuchungen von TÜLLMANN (1976) und EGER (1976) somatische Antigene eine breitere immunogene Wirkung auf Grund ihrer stärkeren Kreuzreaktion besaßen. Der ELISA ist unter Labor - wie Feldbedingungen gut durchführbar. Er wird den Forderungen von TODOROVIC (1975) voll gerecht: Ein Test soll einfach und schnell auszuführen und objektiv zu beurteilen sein, minimale Kosten verursachen und empfindlich reagieren.

III. Eigene Untersuchungen

A.Material und Methoden

Als Versuchstiere standen mir Mäuse, Ratten, Goldhamster, Kaninchen, Hunde und Rinder zur Verfügung. Die NMRI-Mäuse waren ca 6 Wochen alt, hatten ein Gewicht von 20 - 25g und stammten aus der institutseigenen Zucht. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C gehalten. Als Futter erhielten sie Altromin - Mäusestandarddiät und Wasser ad libitum. Zur Antigengewinnung wurden männliche Tiere verwendet, da sie wegen gegenseitiger Unverträglichkeit nur kurz in Gruppen gehalten werden können. Weibliche Mäuse dienten zur Gewinnung antikörperhaltiger Seren, da ihre Haltung über eine längere Zeitdauer problemlos ist.

Die Wistarratten wurden im Institut gezüchtet, hatten ein Alter von 6- 7 Wochen und wogen etwa 50g. Sie standen unter den gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen wie die Mäuse.

Die Goldhamster waren 40 - 50g schwer und hatten ein Alter von 6 - 8 Wochen. Sie kamen zum Teil aus der institutseigenen Zucht und teilweise aus dem Tierhandel. Sie hatten dieselben Haltungs- und Fütterungsbedingungen wie die Mäuse und Ratten. Als zusätzliches Futter erhielten sie Sonnenblumenkerne und Apfelschnitten.

Die Kaninchen mit einem Gewicht von 2 - 3 Kg wurden von einem lokalen Züchter geliefert. Sie lebten in Metalleinzelkäfigen; ihr Futter bestand aus Altromin - Kaninchenhaltungsdiät und Wasser.

Bei den Hunden handelte es sich um Tiere beiderlei Geschlechts der Rasse Beagle. Sie wurden im Institut gezüchtet und hatten ein Alter von 1 Jahr (Hund Nr.17,35,21) bzw. von 4-5 Monaten (Hund Nr.38,39,45,50). Dementsprechend wogen sie 10-15 bzw. 4-5 Kg. Die Tiere waren in Einzelboxen bei Raumtemperatur bzw. in Hütten mit Auslauf untergebracht und erhielten Altromin-Hundehaltungsdiät sowie täglich 1-2 l verdünnte Milch.

Die männlichen Kälber (Rind 1 und 2) der Rasse Holstein-Friesian stammten aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim. Sie hatten ein Gewicht von 120 bzw. 150 Kg und waren bei Versuchsbeginn 12 und 17 Wochen alt. Die 2 1/2 jährige Deutsche Fleckviehkuh (Rind 3) wog 650 Kg. Die Kälber wurden in einer Einstreueinzelbox und die Kuh im Mittellangstand bei einer Stalltemperatur von 20°C gehalten. Als Futter erhielten die Tiere Heu und Wasser ad libitum.
An Parasitenarten verwendete ich Babesia rodhaini, B.galagolata, B.microti, B.musculi, B.canis, B.gibsoni und B.divergens.

Für die Überprüfung der Brauchbarkeit der Antigene standen mir Seren von Rindern zur Verfügung, welche mit Trypanosoma congolense bzw. Babesia bigemina oder B.divergens experimentell infiziert worden waren. Die mit B.divergens infizierten Tiere hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Parasitämie von 65‰ (am 5. Tag) bzw. 170 ‰ (am 8. Tag p.i.). 160 Rinderseren aus verdächtigen Betrieben des bayrischen Voralpenlandes untersuchte ich mit beiden B.rodhaini-Antigenen auf Babesien-Antikörper.
Zur Testung der Brauchbarkeit der metabolischen und somatischen Extraktantigene von B.rodhaini gegen Antikörper von B.caballi konnte ich ein antikörperhaltiges Pferdeserum einsetzen. Daneben hatte ich Seren von

2 serologisch positiven Pferden. Als Negativseren dienten bei Hunden Seren von Gnotobionten, bei Pferden und Rindern Seren von Tieren aus Babesien-freien Gebieten.

B.rodhaini wurde in Mäusen, Ratten und Goldhamstern zur Antigengewinnung gezüchtet. Die aus Mäusen gewonnenen B.rodhaini-Antigene wurden zum Nachweis von B.canis-, B.gibsoni-, B.divergens- und B.caballi-Antikörpern herangezogen, während mit B.rodhaini-Antigenen aus dem Hamster Antikörper bei Babesieninfektionen der Mäuse nachgewiesen wurden. Dies war nötig, da nach Auftrennung des antigenhaltigen Serums die Fraktionen F_1 und F_2 eine hohe Konzentration an metabolischem Antigen sowie an Globulinen enthielten. Im ELISA wären sonst falsche Reaktionen aufgetreten, da die Globuline mit dem gegen dieselbe Tierart gerichteten und mit Peroxydase gekoppelten Antiglobulin reagiert hätten.
Die Mäuse wurden mit 0,3 ml, die Ratten und Hamster mit je 0,5 ml parasitenhaltigem Mäuseblut i.p. infiziert. Das Infektionsmaterial stammte aus Mäusen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Parasitämie von 700‰ aufwiesen. Die Infektionsdosis wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1-2x 10^6 Parasiten pro Maus bzw. auf 3-4x 10^6 Parasiten pro Ratte und Goldhamster eingestellt. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufes entnahm ich täglich Blut aus der Schwanzvene und fertigte Blutausstriche an. Diese wurden nach Giemsa gefärbt,um mikroskopisch den Promillegehalt der infizierten Erythrozyten zu ermitteln. Dabei wurden jeweils 500 Erythrozyten bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt.

Bei Ratten kam es auch 20 Tage p.i. zu keiner Parasitämie. Dies steht im Widerspruch zu Versuchen von COX und MILAR (1968), die Wistarratten erfolgreich infizierten. Jedoch werden bei einer Aufstellung über die Empfänglichkeit der Tierarten für B.rodhaini-Infektionen von DENNIG (1962)

Ratten als unempfänglich angegeben.

Die infizierten Mäuse und Hamster wurden auf dem Höhepunkt der Parasitämie von 800 - 850°/oo bzw. 700 - 750 °/oo nach 6 bzw. 10 Tagen getötet. Anschließend eröffnete ich den Tieren den Brustkorb, zerschnitt das Herz und gewann das Blut mit einer Pasteurpipette. Physiologische Natriumzitratlösung (3,8%) - im Verhältnis 1:20 des Blutvolumens zugesetzt - verhinderte die Blutgerinnung. Auf diese Weise konnte ich pro Maus bzw. Goldhamster 1,0 - 1,5 ml bzw. 2,0 - 2,5 ml Blut gewinnen.

Zur Gewinnung des serumlöslichen oder metabolischen Antigens zentrifugierte ich das babesienhaltige Zitratblut 20 Minuten bei 20.000 Upm (≙44.720g) und + 4°C in einer Sorvall RC 2B Zentrifuge mit einem SS 34 Rotor. Das Plasma wurde abpipettiert, säulenchromatisch fraktioniert bzw. mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt, dialysiert, lyophilisiert und bei - 20°C portioniert gelagert.
Das parasitenhaltige Zellsediment verarbeitete ich zu somatischem Extraktantigen. Die Reinigung von anhaftenden Plasmabestandteilen erfolgte im dreimaligen Auswaschen mit Phosphatpuffer (PBS) und Zentrifugation von je 5 Minuten bei 20.000 Upm (≙44.720g) und + 4°C. Das Sediment wurde mit Phosphatpuffer (PBS) auf das Ausgangsvolumen resuspendiert.

Die Babesien wurden durch Aqua dest.- Hämolyse im Verhältnis 1:9 aus den Erythrozyten freigesetzt. Die Isotonie stellte ich durch Zugabe von gleichem Volumen doppelt physiologischen Phosphatpuffers nach einer Minute wieder her. Durch dieses Verfahren blieben die Parasiten unbeschädigt. Das Hämolysat zentrifugierte ich 20 Minuten bei 15.000 Upm (≙19.942g) und + 4°C ab. Den Überstand verwarf ich und sammelte den Bodensatz, der aus geplatzten Erythrozytenhüllen, Leukozyten und Babesien bestand. Er wurde in wenig PBS gelöst. Die Babesien wurden nach mehrmaligem Frieren und Auftauen

durch Ultraschall zerstört und mit PBS extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei den serumlöslichen Antigenen über die Säulenchromatographie, Dialysierung und Lyophilisierung.

Die säulenchromatographische Auftrennung der metabolischen und somatischen Extraktantigene erfolgte am Ultrogel AcA22 und AcA44 (Fa. LKB) mit einem effektiven Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine eines Molekulargewichtes von 100.000 - 1.200.000 bzw. 10.000 - 130.000. Die Aufbereitung des Gels wurde nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Gelbetthöhe betrug 50 cm mit einem Durchmesser von 2,5 cm. Als Elutionsflüssigkeit diente PBS mit pH 7,4. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 16,0 ml/ Stunde. Die Elutionskurven wurden nach Messung bei 254 nm im Uvicord II (Fa. LKB) geschrieben und die Fraktionen automatisch im Ultro Rac (Fa. LKB) gesammelt. Die Dialyse der Fraktionen erfolgte in Zellophanschläuchen. Das Dialysat bestand aus 1 Teil PBS und 9 Teilen Aqua dest. und bedeckte die zu dialysierende Probe vollständig. Das Gefäß wurde auf einen Magnetrührer gestellt und die Fraktion einer 24- stündigen Dialyse bei +4°C unterworfen. Anschließend lyophilisierte ich sie im Rundkolben. Die Trockenmasse wurde zu 1/10 des Ausgangsvolumens in Aqua dest. gelöst und portioniert bei - 20°C gelagert.

Die Auftrennung des antigenhaltigen Plasmas erfolgte neben der Säulenchromatographie durch Fällung mit Ammoniumsulfat nach MAYR und Mitarb.(1977). Unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer wurde zu einem bestimmten Plasmavolumen die gleiche Menge einer 35%igen $(NH_4)_2SO_4$- Lösung hinzugefügt, die kurz vor Gebrauch auf pH 7,0 mit 2 N NaOH eingestellt wurde. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang gerührt. Das Material blieb 3 - 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen; danach erfolgte für 15 Minuten eine Zentrifugation bei 4.200 Upm (≙2.200g). Den Überstand (A_1) dialysierte ich bei +4°C und löste das Sediment in der gleichen Menge des

Plasmavolumens in PBS (pH 7,2). Die Fällung wurde noch 2x mit 40%iger $(NH_4)_2SO_4$- Lösung wiederholt. Die beiden Überstände (A_2 und A_3) wurden gewonnen und dialysiert. Das letzte Präzipitat (G) nahm ich in einer Puffermenge auf, die der Hälfte oder einem Drittel des Plasmaausgangsvolumens entsprach und dialysierte sie bei + 4°C. Die Dialyse von A_1, A_2, A_3 und G setzte ich so lange fort, bis keine $SO_4^{2\ominus}$ - Jonen im Dialysat mit gesättigter $BaCl_2$ - Lösung nachweisbar waren. A_1, A_2, A_3 und G wurden danach lyophilisiert und portioniert bei - 20°C gelagert.

Zur Herstellung von Hochimmunseren immunisierte ich ein Kaninchen mit dem somatischen Gesamtextraktantigen von B.rodhaini aus der Maus, das mit komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert wurde. Als Kontrolle diente ein Kaninchen, das mit einer Suspension aus gewaschenen Erythrozytenhüllen und Leukozyten der Maus sowie komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert wurde. Bei den Kaninchen wurde 2,0 ml Extraktantigen bzw. Erythrozytensuspension mit 2,5 ml Adjuvans emulgiert und pro Tier 2,0 ml davon s.c. an 2 Stellen an der seitlichen Brustwand injiziert. Für die zweite Immunisierung nach 4 Wochen wurden 2,0 ml Antigenlösung ohne Adjuvans i.p. verimpft. 2 Wochen nach der Boosterung gewann ich die Hochimmunseren, portionierte und lagerte sie bei - 20°C.

Das Material zur Infektion der Mäuse mit B.galagolata, B.microti und B.musculi wurde aus hochparasitämischen Mäusen gewonnen. Diese Tiere waren entmilzt und zeigten bei einer B.galagolata-Infektion eine Parasitämie von 600 - 700°/oo 10 Tage p.i.; dagegen entwickelten Mäuse, die mit B.microti infiziert waren, in der gleichen Zeitspanne Parasitämien von nur 400 - 500°/oo. Erst nach 20 Tagen kam es bei B.musculi-Infektionen zu Parasitämien von 700°/oo. Diese Tiere wurden auf dem Höhepunkt der Parasitämien "geerntet"; ihr Blut diente als Infektionsmaterial für

15 nicht entmilzte Mäuse pro Babesienart, die in 3 Gruppen zu je 5 Mäusen eingeteilt wurden. Die Dosis wurde pro Maus mit physiologischer Kochsalzlösung auf 4x 10^6 Babesien eingestellt und i.p. verabreicht. In den ersten 4-5 Wochen entnahm ich 3x wöchentlich 0,5 ml Blut pro Maus mit der Pasteurpipette aus dem retroorbitalen Venenplexus. Nach 4 Wochen gewann ich 1x wöchentlich und nach 60 Tagen nur mehr 1x in 4 Wochen Blut. Gleichzeitig wurde die Parasitämie jeder Maus im nach Giemsa gefärbten Blutausstrich bestimmt. Dabei errechnete ich das arithmetische Mittel, das die angegebene Parasitämie ergab. Das gewonnene Blut wurde bei +4°C 18 Stunden gelagert und bei 10.000 Upm (≙11.180g) 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, portioniert und bei -20°C gelagert.

Die B.gibsoni-Infektion wurde im Hund Nr.17 i.v. mit 2,0 ml Blut eines entmilzten Tieres gesetzt,das eine Parasitämie von etwa 500‰ zeigte. 3x wöchentlich entnahm ich über 7 Wochen, während der nächsten 10 Wochen einmal wöchentlich und dann pro Monat einmal etwa je 3,0 ml Blut.
Der Hund Nr.35 wurde mit einer 10fach geringeren Dosis als Hund Nr.17 infiziert. Die Gewinnung des Blutes geschah wie bei Hund Nr.17. Die weitere Verarbeitung des Blutes erfolgte wie bei den Mäusen. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufes gewann ich aus der Ohrvene Blut und fertigte zur Parasitenzählung nach Giemsa gefärbte Blutausstriche an. Hund Nr.17 bzw. Nr.35 wurden am 248. bzw. 227. Tage p.i. entmilzt. Nach einem Abort wurde Hund Nr.17 264 Tage p.i. hysterektomiert. Beide Tiere verendeten am 273. und 258. Tage p.i.
5 weitere Hunde wurden mit B.canis infiziert. Bei Hund Nr.21 setzte ich i.v. die Infektion mit 5,0 ml Blut eines Tieres, das eine Parasitämie von 1‰ aufwies. Der Hund wurde 20 Tage p.i. entmilzt und die Infektion mit 10,0 ml Blut des Hundes Nr. 21 mit einer Parasitämie von 1-2% auf

Hund Nr. 38 übertragen. An Hund Nr. 50 wurden 9,0 ml eines ca 20°/oo haltigen parasitämischen Blutes i.v. verabreicht, das von einem Tier stammte, bei dem die Infektion durch Rhipicephalus appendiculatus gesetzt wurde und das 5 Tage p.i. starb. Hund Nr. 45 wurde mit 2,0 ml Blut aus einer Dogge mit akuter Babesiose infiziert. Die Parasitämie lag bei 5°/oo. Die Infektion wurde im Hund Nr. 39 fortgesetzt, dem ich 1,0 ml Blut von Hund Nr. 45 mit einer Parasitämie von 4 - 5°/oo verabreichte. In den ersten 3-4 Wochen entnahm ich 3x wöchentlich, während der nächsten 5 Wochen 1x in der Woche Blut. Die Gewinnung und Verarbeitung des Blutes erfolgte wie bei den mit B.gibsoni infizierten Hunden. Hund Nr. 50 starb 54 Tage p.i. infolge Anämie mit Lungenödem und Leberdystrophie. Die Hunde Nr. 38 und Nr. 45 wurden am 127. Tage und 148 Tage p.i. entmilzt. Hund Nr.38 verendete am 138 Tage p.i.

Rind Nr. 1 wurde mit 80,0 ml B.divergens-haltigem Blut einer Parasitämie von 64°/oo i.v. in die Vena jugularis infiziert. An die Rinder Nr. 2 und 3 wurden je 70,0 ml Blut i.v. verabreicht, das eine Parasitämie von 52°/oo aufwies. In den ersten 4 Wochen p.i. entnahm ich 3x wöchentlich ca 10 ml Blut aus der V. jugularis. Die weitere Behandlung des Blutes erfolgte, wie bei den Mäusen und Hunden beschrieben. Rind Nr. 1 wurde 108 Tage p.i. entmilzt.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten im ELISA erfolgte in einer Eiweißkonzentration der Antigene von 10 µg/ml. In jede Vertiefung der Polystyrol - oder Mikrotiterplatten wurden 0,05 ml Antigenlösung, die mit PBS (pH 7,2) verdünnt wurde, einpipettiert, 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit Leitungswasser ausgewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen von Immunglobulinen an die Polystyrolwand wurden in jede Vertiefung 0,05 ml 2%iges, in Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöstes Rinderalbumin vorgelegt. In die untere Lochreihe pipettierte ich 0,05 ml

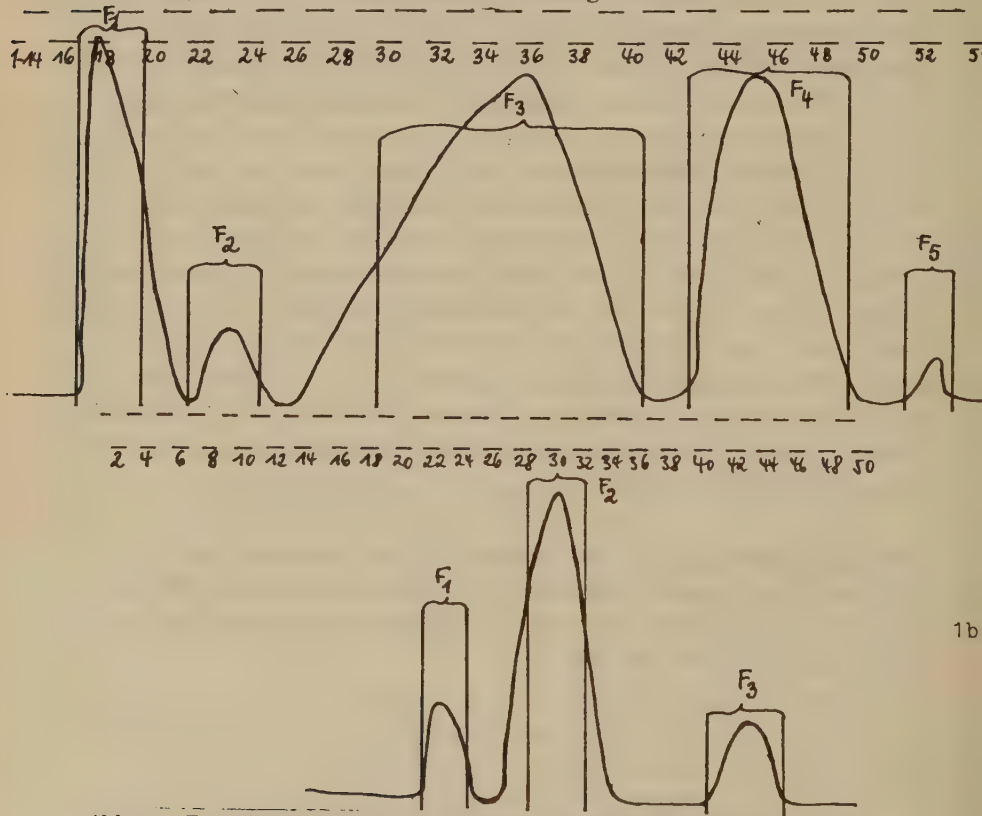
der 1:5 vorverdünnten Seren. Mit Mikrodilutern (Mikrotitersystem der Fa. Cooke, Größe 0,05 ml) wurde eine Serumverdünnungsreihe von 1:10, 1:20, 1:40 etc. hergestellt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und gründliche Auswaschung mit Leitungswasser. Das mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Antiglobulin (Schaf- Anti-Kaninchen-Globulin - PO; Schaf - Anti- Maus - Globulin - PO des Instituts Pasteur; Kaninchen - Anti - Hund - Globulin - PO; Kaninchen - Anti - Rind - Globulin - PO und Kaninchen - Anti - Pferd - Globulin - PO der Firma Paesel Frankfurt) in Verdünnung 1:200 bis 1:600 kam in einer Menge von 0,05 ml/Vertiefung hinzu und wurde nach gleicher Inkubation wieder mit Wasser ausgespült. Durch Zugabe des Substrates (0,05 ml pro Vertiefung) entstand bei positiver Reaktion ein brauner bis violetter Farbumschlag, der nach einer Stunde abgelesen die Bestimmung des Endtiters ermöglichte. Das Substrat bestand aus einer bei 70°C in Aqua dest. gelösten 0,8°/oo 5-Amino- 2 - Hydroxybenzoesäure, die mit 1 N NaOH vor Gebrauch auf pH 6 eingestellt wurde. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit 0,05% Wasserstoffperoxid vermischt.

Die Eiweißbestimmung der Fraktionen erfolgte mit den Testomat® - Protein Reagentien (Fa.Behring) nach den Vorschriften des Herstellers und die Messung bei 546 nm in einem Spektralphotometer.

B. Ergebnisse

1. Die säulenchromatographische Auftrennung der Antigene

Die säulenchromatographische Auftrennung des Ektoantigen-haltigen Mäuseplasmas am Ultrogel AcA22 und AcA44 erbrachte 5 (Abb.1a) bzw. 3 (Abb.1b) Fraktionen. Das Hamsterplasma wurde der Fraktionierung am Ultrogel AcA22 unterworfen und ergab eine Elutionskurve analog der Abb.1a.



1b

Abb.1: Elutionskurven von Seren hochparasitämischer mit B.rodhaini infizierter Mäuse, aufgetrennt
a) am Ultrogel AcA22 mit einem molekularen Trennungsbereich von 100.000 bis 1.200.000
b) am Ultrogel AcA44 mit einem molekularen Trennungsbereich von 10.000 bis 130.000
mit Darstellung der Fraktionen

Auch das somatische Gesamtextraktantigen von B.rodhaini der Maus wurde am Ultrogel AcA22 und AcA44 fraktioniert und lieferte jeweils 3 Fraktionen (Abb.2a und b). Das aus dem Hamster isolierte somatische Gesamtextraktantigen von B.rodhaini erbrachte am Ultrogel AcA44 ebenfalls 3 Fraktionen.

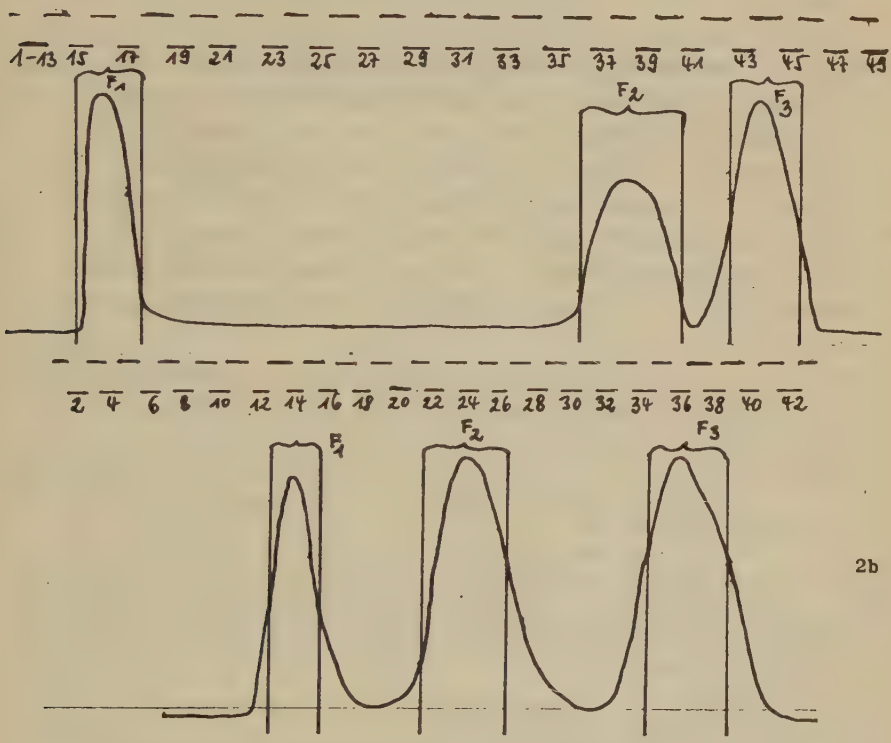


Abb.2:Elutionskurven des somatischen Gesamtextraktantigens aus mit B.rodhaini infizierten Mäusen, aufgetrennt
a) am Ultrogel AcA22 mit einem molekularen Trennungsbereich von 100.000 bis 1.200.000
b) am Ultrogel AcA44 mit einem molekularen Trennungsbereich von 10.000 bis 130.000
mit Darstellung der Fraktionen

2. Reaktionen der Antigenfraktionen mit Hyperimmunseren

Die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen des ektoantigenhaltigen Plasmas und des somatischen Gesamtextraktantigens aus der Maus wurden gegen die Hochimmunseren der mit B.rodhaini sowie mit Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus immunisierten Kaninchen im ELISA getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt, wobei die angegebenen Titer das arithmetische Mittel wiedergeben. Jeweils die Fraktion2 (F_2) des am Ultrogel AcA22 gewonnenen metabolischen (1:160) und somatischen Antigens (1:320) reagierte am stärksten mit dem Immunserum gegen B.rodhaini (Tab.1). Die übrigen Fraktionen ergaben um 1-2 Titerstufen niedrigere Werte. Das Hochimmunserum gegen Erythrozyten-und Leukozyten-Hüllen der Maus lieferte mit den F_2-Fraktionen ebenfalls höhere Titer (1:80 und 1:160) als mit den restlichen Fraktionen.

Immunseren aus Kaninchen gegen	Antigen	Antigenfraktionen von B.rodhaini F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
B.rodhaini	metabolisch	1:40	1:160	1:40	1:40	1:20
	somatisch	1:20	1:320	1:10	--	--
Erythrozyten-und Leukozyten-Hüllen der Maus	metabolisch	1:20	1:80	1:20	1:10	1:10
	somatisch	1:20	1:160	1:10	---	---
negatives Kaninchenserum	metabolisch	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	somatisch	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Tab.1:ELISA-Antikörpertiter in Kaninchen-Hochimmunseren gegen B.rodhaini sowie Erythrozyten-und Leukozyten-Hüllen der Maus mit am Ultrogel AcA22 gewonnenen Fraktionen metabolischer und somatischer Antigene von B.rodhaini aus der Maus

Das Immunserum gegen B.rodhaini erbrachte mit den am Ultrogel AcA44 erhaltenen Fraktionen, der F_1-bzw. F_2-Fraktion des metabolischen bzw. somatischen Antigens die höchsten Titer (Tab.2). Die übrigen Fraktionen lieferten nur Titer von 1:20-1:40. Desgleichen reagierte das Hochimmunserum gegen die Erythrozyten-und Leukozyten-Hüllen der Maus mit allen Fraktionen in Titern von 1:20-1:40.

Immunseren aus Kaninchen gegen	Antigen	Antigenfraktionen von B.rodhaini F_1	F_2	F_3
B.rodhaini	metabolisch	1:160	1:40	1:20
	somatisch	1:40	1:320	1:10
Erythrozyten-und Leukozyten-Hüllen der Maus	metabolisch	1:20	1:20	1:10
	somatisch	1:10	1:40	1:10
negatives Kaninchenserum	metabolisch	neg.	neg.	neg.
	somatisch	neg.	neg.	neg.

Tab.2: ELISA-Antikörpertiter in Kaninchen-Hochimmunseren gegen B.rodhaini sowie Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus mit am Ultrogel AcA44 gewonnenen Fraktionen metabolischer und somatischer Antigene von B.rodhaini aus der Maus

Diese Ergebnisse zeigen,daß unabhängig von der Trennung an 2 verschiedenen Ultrogelen jeweils eine Fraktion am stärksten reagierte und das an beiden Ultrogelen isolierte somatische Antigen höhere Titer als das metabolische erbrachte.

Die am Ultrogel AcA22 gewonnenen Fraktionen aus dem Hamsterplasma,welches das serumlösliche Antigen enthielt,wurde gleichfalls im ELISA gegen die Immunseren eingesetzt.Das Immunserum gegen B.rodhaini reagierte mit den 5 erhaltenen Fraktionen

(F_1,F_2,F_3,F_4,F_5) in Titern von 1:20, 1:40, 1:20, 1:20 und 1:10. Mit dem Immunserum gegen die Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus reagierten alle 5 Fraktionen um eine Titerstufe niedriger als mit dem Hochimmunserum gegen B.rodhaini. Das negative Kaninchenserum zeigte keine Reaktionen. Die am Ultrogel AcA44 gewonnenen 3 Fraktionen (F_1,F_2,F_3) des somatischen Gesamtextraktantigens zeigten mit dem Immunserum gegen B.rodhaini Titer in Höhe von 1:20 mit F_1, von 1:80 mit F_2 und von 1:10 mit F_3. Alle 3 Fraktionen erzielten mit dem Immunserum gegen die Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus um eine Stufe niedrigere Titer als mit dem Hochimmunserum gegen B.rodhaini.
Die 4 durch $(NH_4)_2SO_4$-Fällungen gewonnenen Fraktionen (A_1,A_2,A_3und G) des Plasmas der mit B.rodhaini infizierten Mäuse wurden gleichfalls gegen die Hochimmunseren im ELISA eingesetzt. Das Serum des gegen B.rodhaini immunisierten Kaninchens reagierte mit A_1 1:40, mit A_2 1:20, mit A_3 1:10 sowie mit G mit einem Titer von 1:10. Die Titer des Serums des mit Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus immunisierten Kaninchens waren mit A_1 1:20, mit A_2 1:10, mit A_3 1:10 sowie mit G negativ. Auch hier zeigte das Kontrollserum eines negativen Kaninchens keine Reaktionen mit den 4 Fraktionen.
Zum Antikörpernachweis der Babesien-Infektionen setzte ich diejenigen Fraktionen als Antigene ein, die am stärksten mit den Hyperimmunseren reagierten. Vom metabolischen Antigen erwiesen sich Fraktion 2 (Ultrogel AcA22) und Fraktion 1 (Ultrogel AcA44) als ausreichend wirksam. Es kam lediglich zu Titerunterschieden von einer Stufe, wie sie auch bei Verwendung eines Antigens auftreten können.
Die Auftrennung an Ultrogelen ermöglicht die Gewinnung eines weitgehend gereinigten Antigens. Dies wurde durch die $(NH_4)_2SO_4$-Fällung nicht erreicht.
Das somatische Antigen bildete nach Fraktionierung des Gesamtextraktantigens an beiden Ultrogelen jeweils die Frak-

tion 2.
Eine Verdünnung von 1:50 für das metabolische und von 1:100 für das somatische Antigen, das nach einer Bestimmung des Eiweißgehaltes der Fraktionen einem Gehalt von 10µg/ml entsprach, erwies sich zur Beschichtung der Mikrotiterplatten im ELISA am günstigsten. Die in Tab.1 und 2 angegebenen Titer resultieren aus den wiederholten Ansätzen im ELISA und stellen das arithmetische Mittel dar.

3. Titerverlaufskurven bei experimentell mit Babesien infizierten Mäusen

Mit metabolischem und somatischem Antigen konnte ich bei Mäusen nach experimentellen Infektionen Antikörper nachweisen und Titerverlaufskurven erstellen.

Während der ersten 6 bzw. 11 Tage p.i. reagierte das metabolische Antigen mit dem antikörperhaltigen Serum der mit Babesia galagolata infizierten Mäuse mit Titern von 1:20 bzw. 1:40. Ab dem 13. Tage erfolgte für 2 Tage ein Titeranstieg auf 1:160, der erst am 25. Tage wieder erreicht wurde. 130 Tage p.i. fiel der Titer auf 1:80 (Abb.3).
Bei Verwendung des somatischen Antigens kam es während der ersten 13 Tage p.i. zu einem allmählichen Titeranstieg bis auf 1:160. Diese Titerstufe blieb während der folgenden 113 Tage - abgesehen von einzelnen Schwankungen - erhalten.
Die Parasitämie erreichte mit 390‰ 11 Tage p.i. ihren Höhepunkt und fiel bis 25 Tage p.i. ab. Nach einem kurzfristigen Ansteigen auf 145‰ (Abb. 3) 29 Tage p.i. zeichnete sich erneut ein Abwärtstrend ab.

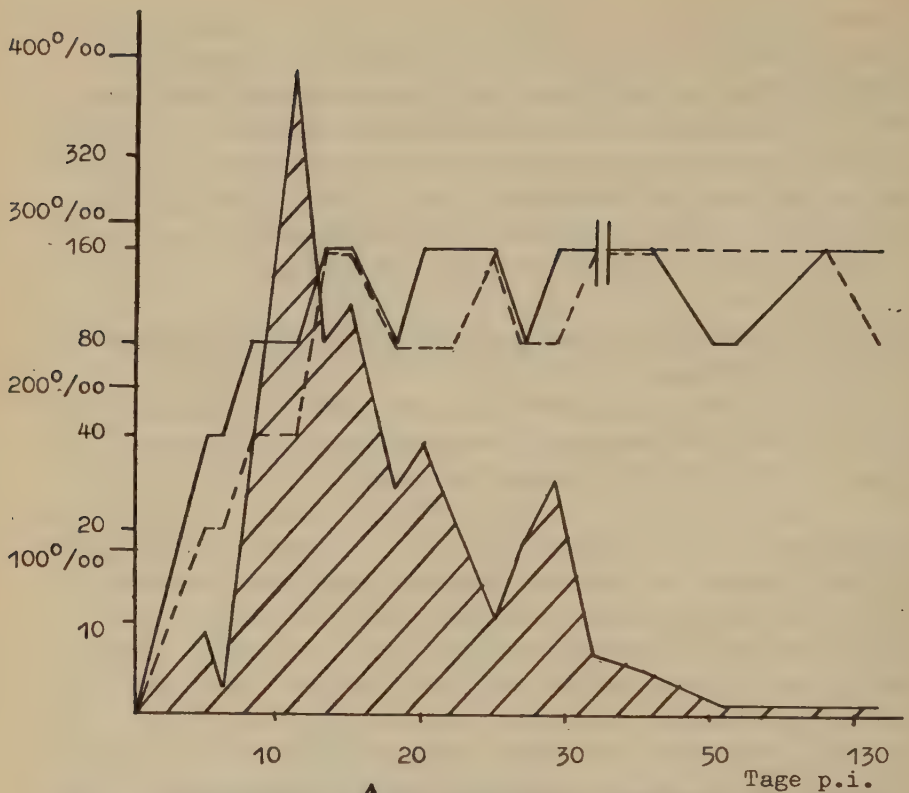


Abb. 3: Parasitämie- und Titerverlaufskurven von 15 mit Babesia galagolata infizierten Mäusen im ELISA bei Verwendung des metabolischen (- - - -) und somatischen (———) Babesia rodhaini-Antigens aus dem Hamster

Beim Einsatz des metabolischen Antigens zum Antikörpernachweis der mit Babesia microti infizierten Mäuse ergab sich ein Titeranstieg nach 7 Tagen von 1:80; er blieb fast konstant bis 49 Tage p.i. und fiel am 130. Tage auf 1:40 (Abb.4). Ähnlich war der Titerverlauf auch bei Verwendung des somatischen Antigens, abgesehen von einem kurzfristigen Abfall auf 1:40. Ab dem 50. Infektionstag kam es zu einem Anstieg auf 1:160. Dieser Titer hielt sich trotz einiger Schwankungen bis 130 Tage p.i.

Die Parasitämie stieg ständig und war 10 Tage p.i. mit 495‰ am höchsten (Abb. 4). Sie fiel während der nächsten 7 Tage auf 110‰. Es verzeichnete sich dreimal ein Ansteigen und Abfallen der Parasitämie, doch erreichte der jeweilige Höhepunkt nie den vorangegangenen Gipfel.

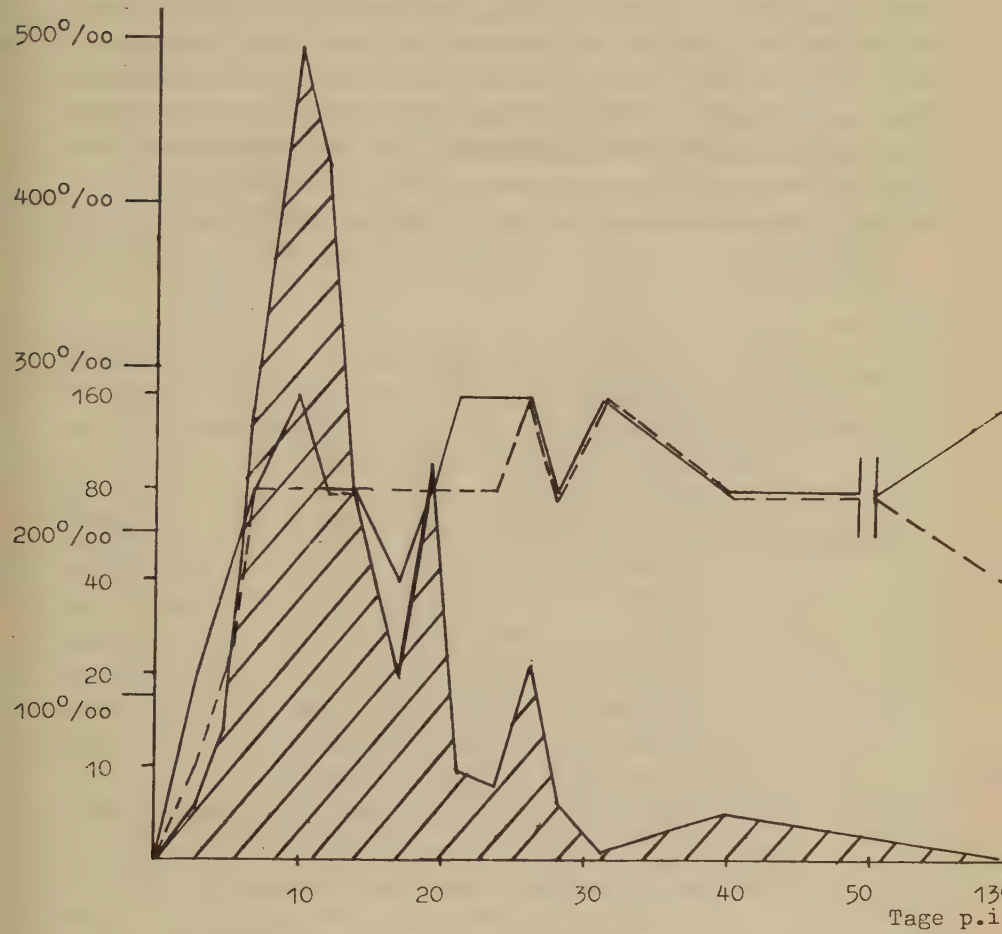


Abb. 4: Parasitämie- ▲ und Titerverlaufskurven bei 15 mit Babesia microti infizierten Mäusen im ELISA bei Verwendung des metabolischen (- - - -) und somatischen (————) Babesia rodhaini-Antigens aus dem Hamster

Mit dem metabolischen Antigen reagierte das antikörperhaltige Serum der mit Babesia musculi infizierten Mäuse 9 Tage p.i.mit einem Titer 1:80. Er wurde während der gesamten Versuchsdauer beibehalten, abgesehen von einem Titerabfall auf 1:40 am 25. und 28. Tage p.i.(Abb.5). Beim Einsatz des somatischen Antigens betrug der Titer am 7. Tage p.i. bereits 1:320; diese Titerhöhe wurde auch am 11. und 21. Tag p.i. erreicht. Dazwischen sank er auf 1:160 und auf 1:80 ab. Ab dem 32. Tage p.i. hielt sich ein Titer von 1:160 bis zum Versuchsende. Die Parasitämie erreichte mit 460‰ einen Höhepunkt, um nach einem Abfall auf 175‰ wieder auf 255‰ anzusteigen. Nach wiederholtem Ansteigen und Absinken betrug sie am 63. Tag p.i. 12‰ (Abb.5).

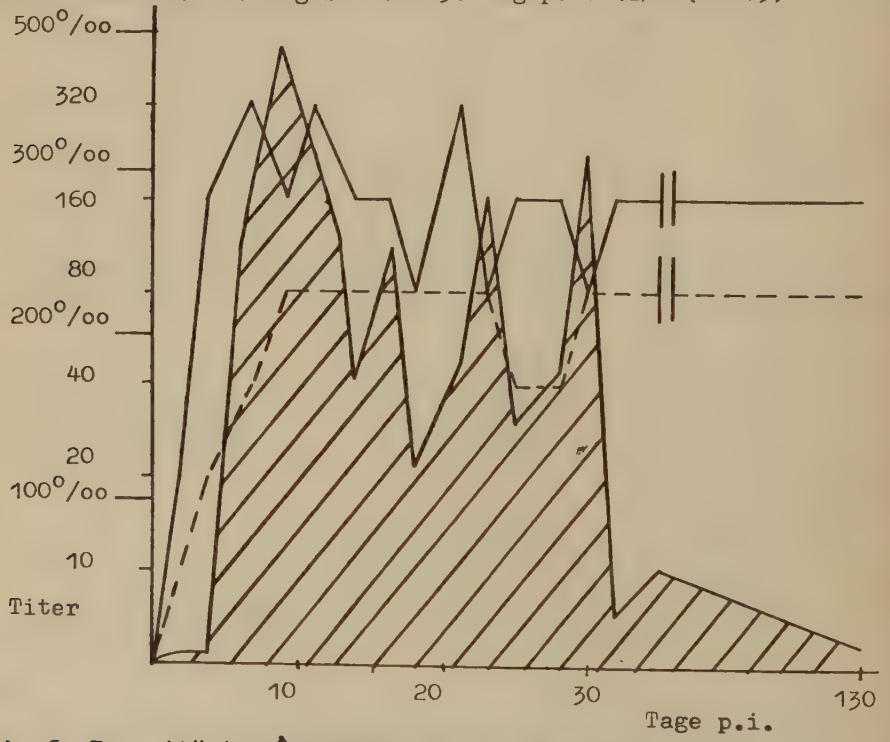


Abb. 5: Parasitämie-⚠ und Titerverlaufskurven bei 15 mit Babesia musculi infizierten Mäusen im ELISA bei Verwendung des metabolischen(- - - -) und somatischen (————) Babesia rodhaini-Antigens aus dem Hamster

4. Titerverlaufskurven bei experimentell mit Babesien infizierten Hunden

Das Serum des mit Babesia canis infizierten Hundes Nr.21 ergab 4 Tage p.i. mit dem metabolischen und 6 Tage p.i. mit dem somatischen Antigen Titer von 1:40. Er stieg am 8. Tage auf 1:80 mit dem metabolischen und auf 1:160 mit dem somatischen Antigen an. Mit beiden Antigenen erreichte er ein Maximum am 12. Tage von 1:160 und fiel auf 1:80 20 Tage p.i.ab. Vom 4. bis 6. Tage p.i. waren vereinzelt Parasiten im Blutausstrich mikroskopisch nachzuweisen. Während der übrigen Zeit blieb der Nachweis negativ. 27 Tage p.i. wurde der Hund entmilzt und entwickelte 8 Tage später eine Parasitämie von 1-2‰. Einen Tag später verendete er.

Das metabolische Antigen reagierte mit den Antikörpern des Hundes Nr.50 bis zum 10. Tage p.i. mit einem Titer von 1:40; dieser stieg auf 1:80 an und erreichte am 22. Tage p.i. 1:160. Bei Versuchsende am 52. Tag p.i. betrug er 1:80 (Abb.6). Bei Verwendung des somatischen Antigens ergab sich ein allmählicher Titeranstieg bis zum 15.Tage p.i. auf 1:160; nach 22 Tagen p.i. ging dieser auf 1:80 zurück und blieb bis zum Tode des Hundes am 54. Infektionstag.
Der Parasitennachweis war nur schwach, vom 8.-12. Tage p.i., vom 24.-33. und vom 39.-52.Tage p. i. in einer Stärke von 1‰ möglich (Abb.6). Der Hund verendete 54 Tage p.i.; Parasiten waren nicht mehr mikroskopisch nachzuweisen.

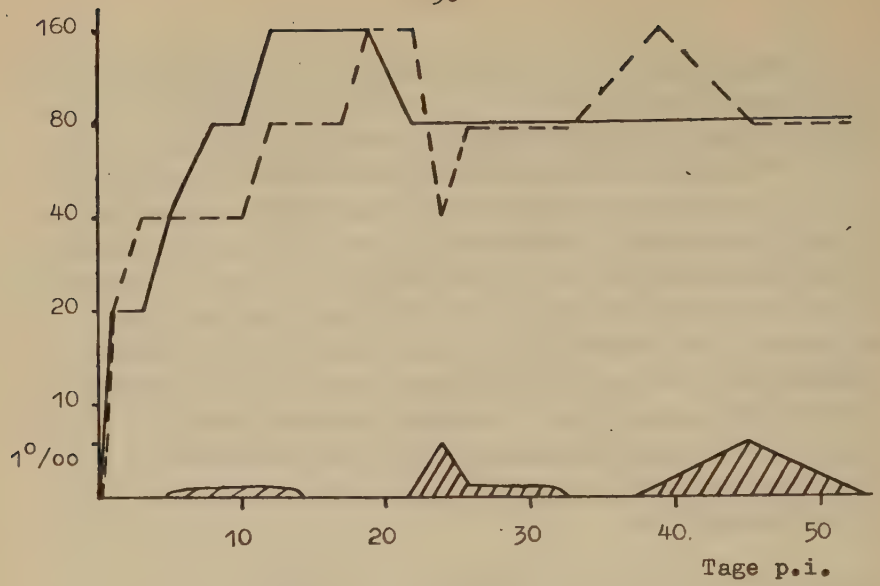


Abb. 6: Parasitämie-△ und Titerverlaufskurven des mit Babesia canis infizierten Hundes Nr.50 im ELISA bei Verwendung des metabolischen (- - - -) und somatischen(———) Babesia rodhaini-Antigens aus der Maus

Unabhängig sowohl von der Infektionsdosis und dem B.canis-Stamm als auch dem ersten Auftreten und der Höhe der Parasitämie zeichnete sich bei den Hunden Nr.38,39,45 ein ähnlicher Titerverlauf ab, so daß die in Abb.7 angegebenen Titer einen Mittelwert darstellen.
Beim Einsatz des metabolischen Antigens stieg der Titer von 1:20 am 3.Tage p.i. auf 1:80 am 7.Tage an und erreichte am 14. Tage 1:160. Am Versuchsende am 130.Tage p.i. sank er auf 1:40. Bei Verwendung des somatischen Antigens waren bereits am 5.Tage p.i. Titer von 1:160 und am 7.Tage von 1:320 festzustellen. Am 19.Tage war ein Maximaltiter von 1:640 erreicht, der während der folgenden 35 Tage allmählich bis auf 1:80 abfiel (Abb.7). Am 67.Tag kam es nochmals zu einer Höhe von 1:320; bei Versuchsende betrug der Titer 1:160.

Mikroskopisch konnten beim Hund Nr.38 bis zum 8.Tage vereinzelt, am 10.Tag maximal 6‰ Parasiten nachgewiesen werden, während die Hunde Nr.39 und 45 bereits nach 3 Tagen p.i. eine Parasitämie von 4‰ und 10‰ aufwiesen. Nach etwa 20 Tagen fiel der mikroskopische Parasitennachweis bei allen 3 Hunden negativ aus. Nach Entmilzung traten beim Hund Nr.45 vereinzelt Parasiten auf; dagegen kam es beim Hund Nr.38 zu einer Parasitämie von 12 ‰.

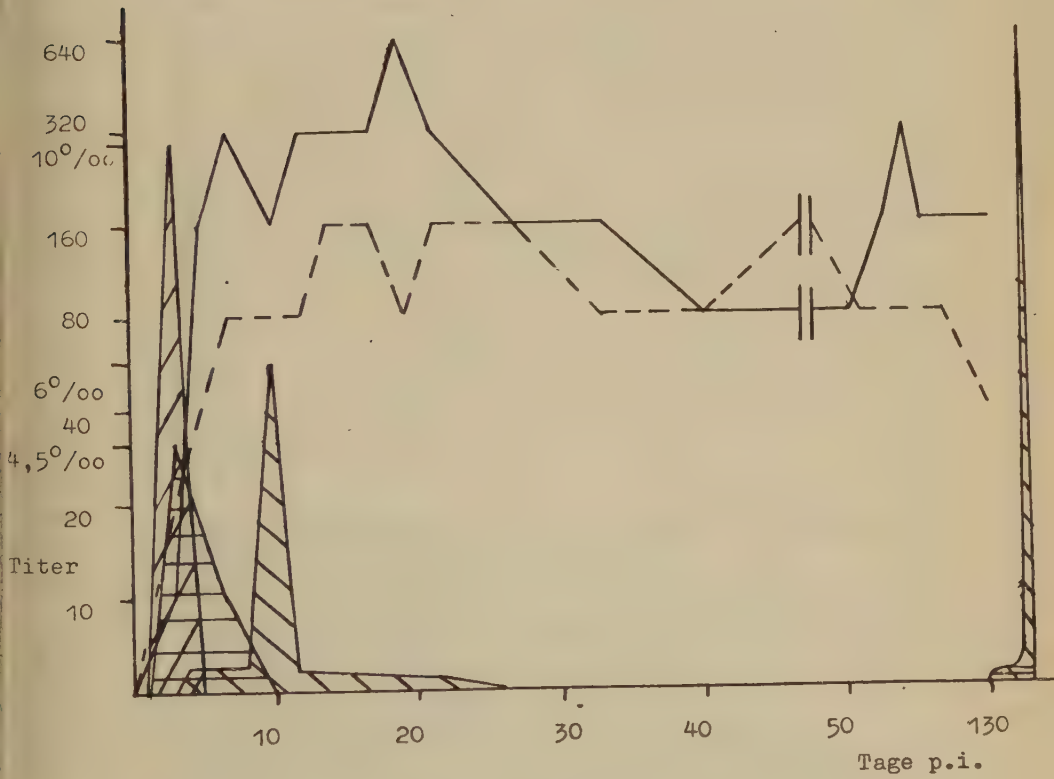


Abb.7: Verlauf der Parasitämie bei 3 mit Babesia canis infizierten Hunden Nr.38▲,Nr.45△,Nr.39▲, und die Titerverlaufskurven im ELISA mit metabolischem (- - - -) und somatischem (———) Babesia rodhaini-Antigen aus der Maus

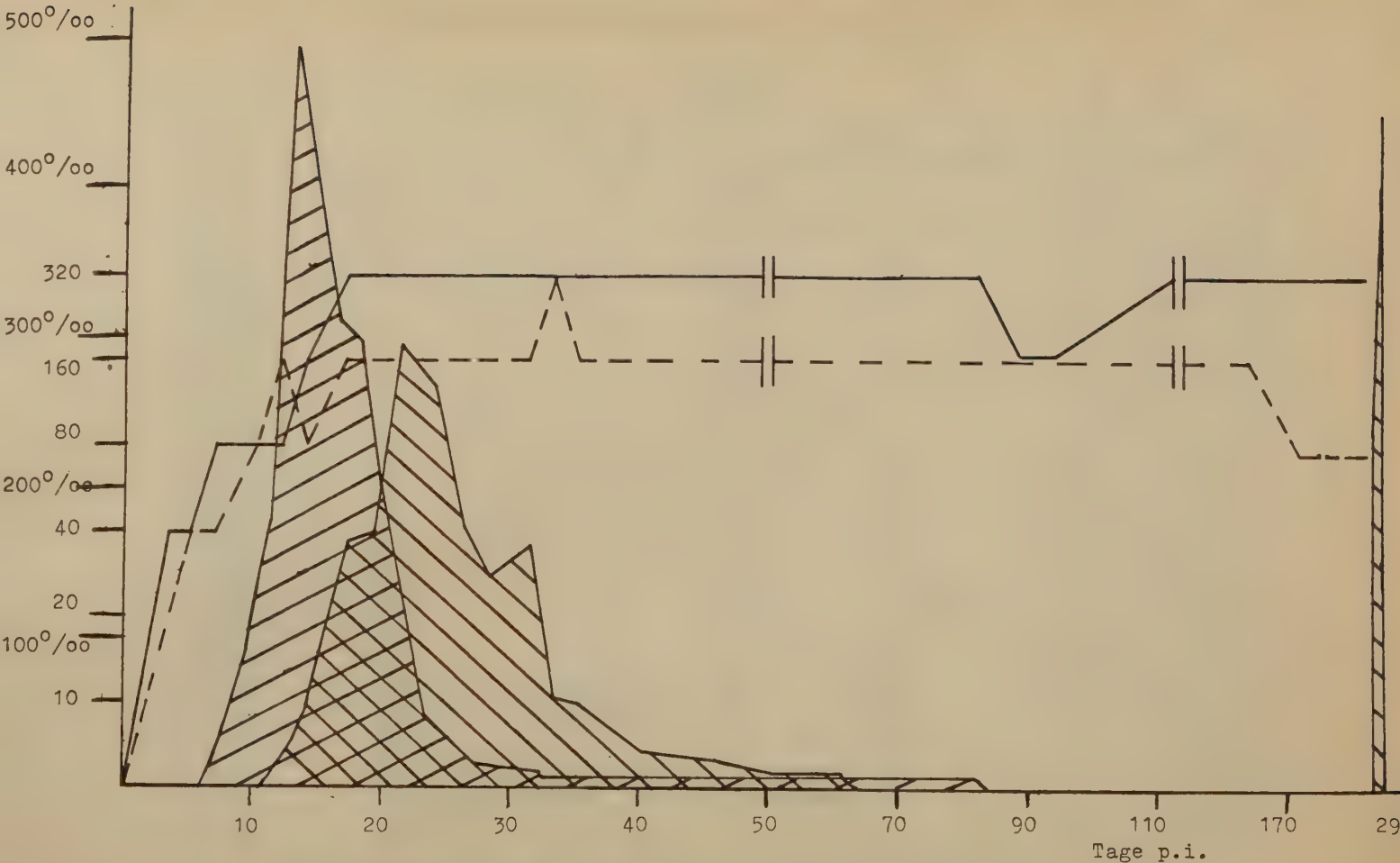


Abb.8: Verlauf der Parasitämie bei 2 mit Babesia gibsoni infizierten Hunden Nr.17 ▲ , Nr.35 ▲ und die Titerverlaufskurven im ELISA mit metabolischem(- - - -)und somatischem(———)B.rodhaini-Antigen aus der Maus

Analog diesen 3 mit B.canis infizierten Hunden entwickelte sich bei den mit Babesia gibsoni infizierten Hunden Nr.17 und Nr.35 trotz unterschiedlicher Höhe und protrahierten Parasitennachweises ein ähnlicher Titerverlauf; die angegebenen Titer geben einen Mittelwert wieder. Bei Verwendung des metabolischen Antigens kam es bis 12 Tage p.i. zu einem Titeranstieg auf 1:160 und am 33.Tage p.i. auf 1:320. Ab dem 35.Tag p.i. hielt sich ein Titer von 1:160 während der folgenden 118 Tage; erst dann sank er auf 1:80 ab (Abb.8). Bei Einsatz des somatischen Antigens stieg der Titer während der ersten 17 Tage p.i. kontinuierlich bis auf 1:320 und hielt sich bis Versuchsende, abgesehen von einigen Schwankungen, auf dieser Höhe.
Beim Hund Nr.17 waren während der ersten 6 Tage p.i. keine Erreger mikroskopisch nachweisbar. Ab dem 9.Tage p.i. stieg die Parasitämie von 95‰ steil auf 495‰ am 13.Tage p.i., um sukzessive während der nächsten 49 Tage abzusinken (Abb.8). Ab dem 10.Tage p.i. zeichnete sich beim Hund Nr.35 ein ständiges Steigen der Parasitämie ab; sie erreichte mit 290‰ am 21.Tage p.i. den Höhepunkt und fiel allmählich bis zum 75.Tage p.i. ab. Nach Entmilzung dieses Hundes trat eine Parasitämie von 450‰ auf.

5. Orientierende Untersuchungen zum Nachweis von Babesieninfektionen bei Rindern und Pferden

Ich infizierte zwar Rind Nr.1 mit Babesia divergens, doch verliefen die mikroskopische Untersuchung und der ELISA mit beiden B.rodhaini-Antigenen vor und nach der Entmilzung während einer Versuchsdauer von $4^1/2$ Monaten negativ. Die Seren der Rinder Nr.2 und Nr.3 reagierten mit beiden Antigenen 2-25 Tage p.i. in Titerstufen von 1:10 - 1:20; allerdings konnten am 29.Tage p.i. im gefärbten Blutausstrich Theilerien nachgewiesen werden; es lag also in beiden Rindern eine Mischinfektion mit Babesia divergens und Theileria mutans vor. Zwei weitere Rinderseren, 5 und 8 Tage nach

einer B.divergens-Infektion gewonnen, reagierten ebenfalls negativ. Das Serum eines mit B.bigemina infizierten Rindes, das mir freundlicherweise Herr Prof. Dr. Friedhoff (Hannover) überließ, zeigte mit dem metabolischen und somatischen Antigen Reaktionen in Titern von 1:20 und 1:40. Dieses Serum diente als Positivkontrolle bei der Testung von 160 Rinderseren aus verdächtigen Betrieben des Voralpenlandes. 7 Seren reagierten mit dem metabolischen Antigen und 19 Seren mit dem somatischen Antigen mit Titern bis 1:40, 53 Seren mit beiden Antigenen mit Titern von 1:10 und 1:20.
Da mir auch Seren von 2 mit Babesia caballi infizierten sowie von 2 Babesiose-verdächtigen Pferden zur Verfügung standen, erschienen mir orientierende Untersuchungen im ELISA ebenfalls interessant. Alle 4 Seren reagierten mit dem metabolischen Antigen mit einem Titer von 1:40, mit dem somatischen mit Titern von 1:80.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit metabolischen und somatischen Antigenen von B.rodhaini Antikörper anderer Babesienarten und damit Infektionen bei Maus, Hund, Rind und Pferd im ELISA nachzuweisen.
DOHNA (1977) fand,daß B.rodhaini-Antigene mit B.galagolata- und B.canis-Antikörpern immunisierter Tiere reagierten; ich setzte diese zum Antikörpernachweis bei infizierten Tieren ein. Die ausgeprägten Kreuzreaktionen der B.rodhaini-Antigene lassen sich mit der antigenen Verwandtschaft der verschiedenen Babesienarten erklären. Sie treten innerhalb einer Tierspezies auf, doch erhielten SIBINOVIC und Mitarb. (1967 a) trotz säulenchromatischer Trennung der Seren Kreuzreaktionen auch mit B.equi, B.canis und B.rodhaini. Es ist deshalb keine serologische Untersuchungsmethode entwickelt worden, mit der eine Artendifferenzierung und Titerbestimmung gleichzeitig möglich war. Sie sind bedingt gegeben, wenn Antigene mit homologem Antiserum in höheren Titern als mit heterologem Antiserum reagieren. Auch ich konnte beim Einsatz der B.rodhaini-Antigene keine Artendifferenzierung erarbeiten.
Nachdem DOHNA (1977) der Antikörpernachweis in immunisierten Mäusen und Hunden mit metabolischem B.rodhaini-Antigen gelang sowie PURNELL und HENDRY (1976) den Titerverlauf einer B.divergens-Infektion mit somatischem Extraktantigen im ELISA verfolgen konnten, waren in meinen Untersuchungen mit säulenchromatographisch fraktioniertem metabolischen und somatischen B.rodhaini-Antigen Antikörper bei experimentell infizierten Mäusen und Hunden im ELISA nachweisbar. Desgleichen konnte ich in Seren von mit B.caballi infizierten Pferden und mit B.bigemina infizierten Rindern Antikörper mit beiden Antigenen erfassen.
Um ein möglichst gereinigtes metabolisches Antigen für meine Untersuchungen zu erhalten, versuchte ich die Trennung dieser antigenen Substanz von den Plasmabestandteilen. Die

Auftrennung des ektoantigenhaltigen Plasmas am Ultrogel AcA22 ergab 5 Fraktionen und ließ eine bessere Isolierung des Antigens als am Ultrogel AcA44 mit 3 erhaltenen Fraktionen vermuten. Doch zeigten Fraktion 2 (Ultrogel AcA22) und Fraktion 1 (Ultrogel AcA44) fast gleich starke Reaktionen mit den Hyperimmunseren.Nach ähnlichen Untersuchungen von SIBINOVIC und Mitarb. (1967 a) und von DOHNA (1977) könnte es sich bei diesen Antigenen um Substanzen mit komplexer chemischer Struktur im Molekularbereich der ß-Globuline handeln. Eine Fraktion enthielt somit Antigene und ß-Globuline, so daß eine reine Isolierung des metabolischen Antigens auch nach Fraktionierung an 2 verschiedenen Ultrogelen nicht möglich war. Auch SIBINOVIC und Mitarb. (1965) konnten nach Ammoniumsulfatfällung und elektrophoretischer Auftrennung eines ektoantigenhaltigen Plasmas diese Antigene nicht von den ß-Globulinen trennen. Es ist anzunehmen, daß das Serum des gegen Erythrozyten- und Leukozyten-Hüllen der Maus immunisierten Kaninchens Antikörper gegen ß-Globuline enthielt. Durch diese Konzentration der ß-Globuline in der Fraktion 1 bzw. 2 sind die hohen Titer der Kontrollseren erklärbar.
Durch die Ammoniumsulfat-Fällung versuchte ich eine Trennung der γ- Globuline von den übrigen Serumbestandteilen. Hierbei enthielt Fraktion A_1, welche am stärksten mit den Hochimmunseren reagierte, alle Serumproteine, außer den γ-Globulinen, und beinhaltete noch mehr "Verunreinigungen" als die antigenhaltigen Fraktionen nach der Säulenchromatographie. Auch SIBINOVIC und Mitarb. (1965) erhielten aus Seren mit B.caballi infizierter Pferde durch diese Fällung Fraktionen, die den elektrophoretisch gewonnenen serologisch ähnelten. Allerdings waren die Reaktionen mit den durch Ammoniumsulfat gefällten Fraktionen weniger oft reproduzierbar.
Das somatische B.rodhaini-Antigen reagierte mit den Hoch-

immunseren sowie den Seren der infizierten Tiere stärker als das metabolische Antigen. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von EGER (1976) und TÜLLMANN (1976), die somatischen Extraktantigenen eine größere immunisierende Wirkung als metabolischen Antigenen zuerkannten. Die von mir aus Hamstern gewonnenen Antigene reagierten um 2 Titerstufen niedriger als die vergleichbaren Fraktionen,die aus mit B.rodhaini infizierten Mäusen stammten. Es könnte dies durch einen gewissen Antigenitätsverlust erklärt werden, da Hamster im Gegensatz zu Mäusen eine B.rodhaini-Infektion trotz hoher Parasitämie überleben.

Bei den mit Babesien infizierten Hunden traten die Parasitämien umso früher und stärker auf, je höher die Infektionsdosen waren.

Nach einer Babesien-Infektion hängt die Zeit, ab der Antikörper nachweisbar sind, von der Empfindlichkeit des jeweiligen serologischen Testes ab. Im Gegensatz zu allen in der Literatur beschriebenen serologischen Untersuchungen, bei denen positive Reaktionen zeitlich mit dem Auftreten einer Parasitämie zusammenfallen, erhielt ich im ELISA zumindest niedere Titer, bevor Parasiten mikroskopisch erfaßbar waren. Inwieweit diese Titer als unspezifisch zu werten oder auf eine größere Empfindlichkeit des ELISA zurückzuführen sind, kann ich nicht beurteilen. Das visuelle Ablesen der Titer stellt sicherlich eine subjektive Beurteilung dar, doch haben VOLLER und Mitarb. (1975) nach vergleichendem Interpretieren der Ergebnisse visuell und mit dem Photometer eine fast 100%-ige Übereinstimmung erzielt. Titer in niederen Bereichen (1:5 und 1:10) können nach TÜLLMANN (1976) auch durch Resthämoglobin, das den Antigenen noch anhaftet, oder durch molekulare Umwandlung der B.rodhaini-Antigene durch Extraktion und Aufbewahrung bedingt sein.

Ungeachtet der Babesienart steigt nach der Infektion der Titer bis 1:160 - 1:320 an und fällt allmählich auf 1:40 - 1:80 ab. Auch ROSS und LÖHR (1968) sowie SIBINOVIC, SIBINOVIC und RISTIC (1969) kamen nach Infektionsversuchen an Rindern und Pferden zu gleichen Ergebnissen. Der nach der Infektion früh erreichte Antikörpergipfel hängt nach COX und TURNER (1970) von der gleichzeitigen Synthese von IgM- und IgG-Antikörpern ab. Während diese Autoren keinen Titerabfall und Ersatz der IgM- durch IgG-Antikörper beobachteten, kann nach WALLACE,OSLER und MAYER (1950) der Titerabfall auch durch Ersatz der IgM- durch IgG-Antikörper bedingt sein. Dabei kompensiert die größere Affinität der IgG-Antikörper zu den Antigenen den Abfall der gesamtspezifischen Antikörper. In einem Zeitraum von 20-170 Tagen p.i., in dem der mikroskopische Parasitennachweis nicht gelang, konnten dennoch im ELISA Babesien-Antikörper nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von MAHONEY (1962) sowie von SIBINOVIC und Mitarb. (1965).

Eine Babesiose ist dadurch charakterisiert, daß trotz spezifischer Antikörperbildung keine vollkommene Immunität erreicht wird und Tiere, die eine Infektion überstehen , Parasitenträger bleiben. Dies fand Bestätigung bei den Hunden Nr.21,38,45,35, bei denen der mikroskopische Parasitennachweis 150 Tage negativ ausfiel, obwohl sie nach ihrer Entmilzung wieder Parasitämien zeigten.

Abweichend von diesen Hunden ist der Infektionsverlauf bei Hund Nr.50, bei dem Babesien in unterschiedlichen Abständen mikroskopisch nachweisbar waren. Dies stellten auch SIBINOVIC und Mitarb. (1967 b) an mit B.canis infizierten Hunden fest. Die Parasitämien können mit der Virulenz des Babesienstammes, der schwachen Immunlage des Tieres und der ständigen Wandlung der Antigenstruktur der Parasiten erklärt werden.

Bei den mit Babesien infizierten Mäusen erhielt ich ebenfalls positive Titer vor Auftreten von Parasitämien sowie ein rasches Ansteigen und langsames Abfallen der Titer während des Infektionsverlaufes. Im Gegensatz zu den Hunden konnte ich bei einzelnen Tieren Parasiten 130 Tage lang nachweisen. Da mir aber eine größere Anzahl Mäuse bei der Durchführung dieser Infektionsversuche zur Verfügung stand, war die Wahrscheinlichkeit größer, zumindest in einem Tier der Gruppe einen positiven Erregernachweis zu führen.

Bei Rindern gelang mir die experimentelle Infektion mit B.divergens nicht. Serologie und Parasitennachweis, auch nach der Entmilzung, fielen bei Rind Nr.1 negativ aus. Seren der Rinder Nr.2 und 3 reagierten im ELISA in Titern von 1:10 und 1:20. Da diese Tiere eine Mischinfektion mit Babesien und Theilerien hatten, können die Titer unspezifisch sein oder von einer oder beiden Infektionen herrühren. Gründe für das Nichtangehen der Infektion könnten Infektionsdosis und Virulenz des Babesienstammes sein. Die Infektion habe ich im Gegensatz zu Versuchen von TREES (1978) mit 3×10^9/Parasiten pro 100 kg/KG bei weitem überschritten. Das infektiöse Blut stammte von Tieren, die an Babesiose starben.

Bei Testung der 160 Rinderseren aus dem bayrischen Voralpenland reagierte ein Drittel aller Tiere in Titern von 1:10 und 1:20, 19 Tiere erreichten einen Titer von 1:40. Auf Grund dieser niedrigen Titerstufen kann ich keine Aussage über eine eventuelle Durchseuchung machen, da zur Bestätigung der serologischen Ergebnisse der direkte Erregernachweis nicht geführt werden konnte.

Da Seren von experimentell mit B.bigemina infizierten Rindern und mit B.caballi infizierten Pferden positiv reagierten, halte ich den Test zur Diagnose auch dieser Infektionen für geeignet. Bei der Untersuchung eines antikörperhaltigen Trypanosoma congolense-Serums eines

Rindes traten Kreuzreaktionen nicht auf.
Beim gleichzeitigen Einsatz von metabolischem und somatischem B.rodhaini-Antigen zum Antikörpernachweis von Babesien-Infektionen im ELISA erwies sich somatisches Antigen wirksamer, erbrachte höhere Titer und damit eindeutigere Ergebnisse. Deshalb wird somatisches B.rodhaini-Antigen für Durchseuchungsuntersuchungen bei den verschiedensten Tierarten empfohlen.

V. Zusammenfassung

Metabolische und somatische Antigene von Babesia rodhaini wurden nach ihrer Gewinnung aus hochparasitämischen Mäusen und Hamstern und nach säulenchromatographischer Auftrennung im Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) an Hyperimmunseren getestet. Die am stärksten reagierenden Fraktionen wurden als Antigene zum Antikörpernachweis von Infektionen anderer Babesia-Arten herangezogen; somatisches Antigen reagierte stärker als metabolisches.
Nach experimentellen Infektionen von Mäusen mit Babesia galagolata, Babesia microti und Babesia musculi sowie von Hunden mit Babesia canis und Babesia gibsoni wurden Parasitämie- und Titerverlaufskurven erstellt. Bei Mäusen konnte neben dem Antikörpernachweis im ELISA während des gesamten Versuchszeitraumes von 130 Tagen auch der direkte Parasitennachweis im gefärbten Blutausstrich geführt werden. In einem Zeitraum von 20-170 Tagen p.i., in dem der mikroskopische Erregernachweis bei den infizierten Hunden nicht mehr gelang,konnten dennoch im ELISA Babesien-Antikörper nachgewiesen werden. Nach Entmilzung dieser Tiere waren Babesien im gefärbten Blutausstrich wieder mikroskopisch nachweisbar.
Mit metabolischem und somatischem B.rodhaini-Antigen ließen sich Babesien-Infektionen bei Rind und Pferd nachweisen.
Das leicht aus Mäusen zu gewinnende und stark reagierende somatische B.rodhaini-Antigen eignet sich für Durchseuchungsuntersuchungen.

Summary

The suitability of Babesia rodhaini antigens for the detection of babesial infections by means of ELISA

Metabolic and somatic antigens of Babesia rodhaini were isolated from parasitemic mice and hamsters, chromatographically fractionated and tested by means of the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) against hyperimmunsera. Antigen fractions, showing strongest serologic reactivities, were employed for the detection of antibodies against different Babesia infections. The somatic antigen reacted stronger than metabolic antigen.

From mice, experimentally infected with Babesia galagolata, Babesia microti and Babesia musculi, and from dogs, experimentally infected with Babesia canis and Babesia gibsoni, the parasitemias and antibody formations were demonstrated. During the 130 days period of investigation it was possible to demonstrate both, babesial antibodies by means of ELISA and parasites in Giemsa stained blood smears, in mice. Over a period of 20 to 170 days post infection antibodies against Babesia were demonstrable by means of ELISA in dogs, although no parasites were detectable in the stained blood smears. Splenectomy of these animals caused a new appearance of parasites in the blood. By means of metabolic and somatic antigens of B.rodhaini babesial infections could be detected in cattle and horses.

The somatic antigen of B.rodhaini suits for serological Babesia surveys by means of ELISA.

VI. Literaturverzeichnis

1. Cox, F.E.G., S.A. Turner (1970): Antibody levels in mice infected with Babesia microti.
Ann. Trop. Med. Parasit. 64, 167-173

2. Cox, W.H., R. Milar (1968): Cross-protection immunization by Plasmodium and Babesia infections of rats and mice.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 173-179

3. Curnow, I.A., B.A. Curnow (1967): An indirect haemagglutination test for the diagnosis of Babesia argentina infection in cattle.
Austr. Vet. J. 43, 286-290

4. Dennig, H.K. (1962): Experimentelle Übertragung von Babesia bovis,B.bigemina, B.equi, B.caballi und B.trautmani auf säugende Mäuse.
Z. Tropenmed. Parasit. 13, 472-479

5. Dohna, H. Graf zu (1977): Serologische Untersuchungen über Ektoantigene von Babesia rodhaini, Babesia galagolata und Babesia canis in der Immunodiffusion,Gegenstromelektrophorese und im ELISA-Test.
Vet. Med. Diss., München

6. Donnelly, J., L.P. Joyner, P.J. Crossman (1972): The incidence of Babesia divergens infection in a herd of cattle as measured by the indirect immunofluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 13, 511-514

7. Eger,R. (1976): Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen B.rodhaini, B.musculi, B.microti und B.galagolata.
Vet. Med. Diss., München

8. Engvall,E., P.Perlmann (1972): Enzyme- Linked- Immunosorbent - Assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled-anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.
J.Immunol. 109, 129-135

9. Goldmann, M., E. Bukovsky (1975): Extraction and preliminary use for diagnosis of soluble precipitating antigens from Babesia bigemina.
J. Protozool. 22, 262-264

10. Goodger, B.V. (1971): Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis.
Austr. Vet. J. 47, 251-256

11. Hirato, K., N. Ninomiya, Y. Uwano, T. Kutil (1945): Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis. Jap. J. Vet. Sci. 7, 204-205

12. Joyner, L.P., J. Donnelly, R. Payne (1972): The indirect fluorescent antibody test for the differentiation of infections with Babesia divergens or B.major. Res. Vet. Sci. 13, 515-518

13. Löhr, K.F., I.P.I. Ross (1969): Capillary tube agglutination test for the detection of Babesia bigemina antibody. Z. Tropenmed. Parasit. 20, 287-292

14. López, G., R.A. Todorovic (1978): Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of Babesia argentina. Vet. Parasit. 4, 1-9

15. Mahoney, D.F. (1962): Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. Austr. Vet. J. 38, 48-52

16. Mahoney, D.F. (1964): Bovine babesiosis:an assessment of the significance of complement fixing antibodies based upon experimental infection. Austr. Vet. J. 40, 369-375

17. Mahoney, D.F. (1967): Bovine babesiosis: preparation and assessment of complement fixing antigens. Expl Parasit. 20, 232-241

18. Mayr, A., P.A. Bachmann,B. Bibrack, G. Wittmann (1977): Virologische Arbeitsmethoden.Band II, Serologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

19. Popovic, N.A., M. Ristic (1970): Diagnosis of canine babesiasis by a gel precipitation test. Am.J. Vet. Res. 31, 2201-2204

20. Purnell, R.E., D.I. Hendry (1976): Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to Babesia divergens in cattle. Vet. Rec. 99, 102

21. Ristic, M., S. Sibinovic (1964): Equine babesiosis: diagnosis by a precipitation in gel and by a one-step fluorescent antibody-inhibition test. Am. J. Vet. Res.25, 1519-1526

22. Ross, J.P.J., K.F. Löhr (1968): Serological diagnosis of Babesia bigemina infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test.
Res. Vet. Sci. 9, 557-561

23. Schindler, R., H.K. Dennig (1962): Versuche zum Nachweis von Antikörpern gegen Babesien mit der Komplementbindungsreaktion.
Z. Tropenmed. Parasit. 13, 480-488

24. Sibinovic, K.H., M. Ristic, S. Sibinovic, T.N. Phillips (1965): Equine babesiosis: isolation and serologic characterization of a blood serum antigen from acutely infected horses.
Am. J. Vet. Res. 26, 147-153

25. Sibinovic, K.H., R. MacLeod, M. Ristic, S. Sibinovic, H.W. Cox (1967 a): A study of some of the physical, chemical and serologic properties of antigens from sera of horses,dogs and rats with acute babesiosis.
J. Parasit. 53, 919-923

26. Sibinovic,K.H., S. Sibinovic, M. Ristic, W.H. Cox (1967 b): Immunogenic properties of babesial serum antigens.
J. Parasit. 53, 1121-1129

27. Sibinovic, S., K.H. Sibinovic, M. Ristic (1969): Equine babesiosis: diagnosis by bentonite agglutination and passive hemagglutination tests.
Am. J. Vet. Res. 30, 691-695

28. Todorovic, R.A. (1975): Serological diagnosis of babesiosis: A review.
Trop.Anim. Hlth. Prod. 7, 1-14

29. Todorovic, R.A., L.G. Adams (1971): Serodiagnosis of babesiosis.
Proc. XIX World Vet. Congress, Mexico City, Mexico 15.-22. August 71, 3, 1114-1116

30. Todorovic, R.A. K.L. Kuttler (1974): Babesiosis card agglutination test.
Am. J. Vet. Res. 35, 1347-1350

31. Todorovic, R.A., R.F. Long (1976): Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of Babesia spp. infections in Colombian cattle.
Tropenmed. Parasitol. 27, 169-181

32. Trees, A.I. (1978): Indirect fluorescent antibody levels in experimental Babesia divergens infections of cattle.
Res. Vet. Sci. 24, 126-128

33. Tüllmann, K. (1976): Untersuchungen über antigene Eigenschaften von B.rodhaini und B.musculi in der Immunodiffusion, Gegenstromelektrophorese und Immunelektrophorese am Modell der Maus.
Vet. Med. Diss., München

34. Voller, A., C. Draper, D.E. Bidwell, A. Bartlett (1975): Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas disease.
Lancet, 426-428

35. Wallace, A.L., A.G. Osler, M.M. Mayer (1950): Quantitative studies of complement-fixation.V. Estimation of complement-fixing potency of immune sera and its relation to antibody-nitrogen content.
J. Immunol. 65, 661-673

36. Weiland, G., H. Dohna (1978): Die Brauchbarkeit des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von Babesien-Antikörpern in Hochimmunseren mit Hilfe von Ektoantigenen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 33-35

37. Zuckerman, A., M. Ristic (1968): Blood parasite antigens and antibodies. In:Infectious Diseases of Man and Animals, 79-122. Academic Press, New York.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. J. Boch danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Weiland, der mir bei der Durchführung dieser Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Fräulein B. Schmöger danke ich recht herzlich für ihre bereitwillige und liebenswürdige Hilfe in allen technischen Fragen.

Lebenslauf

Am 21.10.1944 wurde ich als Tochter des Tierzuchtbeamten Josef Kratzer und seiner Ehefrau Pauline, geborene Ketterl, in Bayrischzell/Landkreis Miesbach geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich in das Mädchenrealgymnasium der Armen Schulschwestern am Anger in München ein und legte im Juli 1965 die Reifeprüfung ab.

Das Apothekerpraktikum beendete ich 1967 mit dem pharmazeutischen Vorexamen. Naturwissenschaften-Pharmazie studierte ich an der Universität München, der Philosophisch-Theologischen Hochschule Bamberg und der Universität Würzburg; dort bestand ich im Juni 1972 das pharmazeutische Staatsexamen. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im September 1972.

Im Wintersemester 1972 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München und schloß es im Oktober 1977 mit dem Staatsexamen ab.